

**DAS SEKRETIONSVERHALTEN DER
PROTEINASEINHIBITOREN, PHOSPHATASEN UND
DER BAEE-ESTERASE (KALLIKREIN)
IM FRAKTIONIERT GEWONNENEN
RUHE- UND REIZSEKRET
GESUNDER MENSCHLICHER
OHRSPICHELDRÜSEN**

Wolfgang Hepperle

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0091

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Kranke
der Universität München

Direktor: Professor Dr. med. H.H. Naumann

DAS SEKRETIONSVERHALTEN DER PROTEINASEINHIBITOREN,
PHOSPHATASEN UND DER BAEE-ESTERASE (KALLIKREIN)
IM FRAKTIONIERT GEWONNENEN RUHE- UND REIZSEKRET
GESUNDER MENSCHLICHER OHRSPEICHELDRÜSEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Hepperle
aus
Neu-Ulm

München 1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.H. Naumann
 2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H. Eichner
 3. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Brendel
- Dekan: Prof. Dr. W. Spann
- Tag der mündlichen Prüfung: 18.1.1977



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A) Einleitung	1
B) Theoretischer Teil	3
Speichelchemie	3
I.) Trypsininhibitor	3
II.) Phosphatasen	5
III.) BAEE - Esterase	6
C) Experimenteller Teil	8
I.) Sekretgewinnung	8
II.) Durchführung der Versuche und Auswertung	8
1.) a) Proteolytische Aktivität	8
Material	8
Versuchsbeschreibung	9
Ergebnis	10
b) Trypsininhibitor	10
Material	10
Versuchsbeschreibung	10
Ergebnis	12
Diskussion	18
2.) Phosphatasen	20
a) Alkalische Phosphatase	20
Material	20
Versuchsbeschreibung	20
Ergebnis	21
b) Saure Phosphatase	22
Material	22
Versuchsbeschreibung	22
Ergebnis	23
Diskussion	36

	Seite
3.) BAEE - Esterase	38
Material	38
Methode	38
Versuchsbeschreibung	39
Diskussion der Bestimmungs-	
methode	40
Ergebnis	42
Diskussion	48
D) Zusammenfassung	49
Literaturverzeichnis	

A) E i n l e i t u n g

Der Speichel kommt als erstes Verdauungssekret mit der aufgenommenen Nahrung in Berührung. Er macht die von den Zähnen grob zerkleinerte Nahrung nicht nur gleitfähig, sondern beginnt auch schon mit der Verdauung ihrer Bestandteile, z.B. der Stärke durch sein Enzym Ptyalin. Außerdem unterstützt er Quellungsvorgänge der Nahrung, hält den Mund feucht und bildet das Lösungsmittel für Moleküle, die die Geschmacksrezeptoren stimulieren. Die hochsignifikante Erkrankungsrate an Karies bei Patienten mit mangelhafter Speichelsekretion zeigt seine Bedeutung für den Zahnstoffwechsel.

Den weitaus größten prozentualen Anteil an der Gesamtspeichelsekretion haben drei paarig angelegte Drüsen, die glandulae parotides, sublinguales und submandibulares. Außerdem gibt es in der Mundhöhle, z.B. auf der Zungenoberfläche, noch eine große Zahl kleiner und in Bezug auf ihre Sekretmenge unbedeutender Speicheldrüsen.

Die täglich sezernierte Speichelmenge beträgt ungefähr 1,5 Liter, was bei einem Gesamtgewicht der großen Speicheldrüsen von ca. 65 Gramm die Sekretionsleistung dieser Drüsen aufzeigt.

Histologisch ist die Parotis eine seröse Drüse, die Submandibularis eine gemischte und die Sublingualis eine muköse Drüse. Ebenso unterschiedlich wie ihre Morphologie ist auch die Zusammensetzung ihrer Sekrete.

Da sich die Sekrete dieser Drüsen in Menge und Zusammensetzung bei verschiedenen Reizen ändern und dies auch bei manchen Krankheiten zu tun scheinen, besteht die Möglichkeit, hier krankheitsspezifische Veränderungen zu finden, wie sie z.B. in der Blutchemie bei Elektrolytveränderungen u.a. schon lange bekannt sind.

Aufgabe dieser Arbeit war es, für bestimmte Bestandteile des Sekretes der Ohrspeicheldrüse Normalwerte zu finden, die zum Vergleich mit den Ergebnissen bei bestimmten Krankheitsbildern geeignet sind.

) Theoretischer Teil

Speichelchemie

Untersuchungen der Zusammensetzung des Speichels, die schon von vielen Autoren vorgenommen wurden, ergaben eine große Vielfalt von Einzelbestandteilen. Obwohl diese teilweise chemisch eine große Übereinstimmung mit den Blutserumfraktionen zeigen, konnte man häufig starke Abweichungen in den Konzentrationen feststellen. Im einzelnen wurden, um nur einige Bestandteile zu nennen, Immunglobuline, Albumin, Phosphatasen, Esterasen und Amylasen gefunden.

Da in sehr vielen Arbeiten der Gesamtspeichel untersucht wurde, also keine Trennung nach der Drüsenart vorgenommen wurde, ist es naheliegend, das Sekretionsverhalten einer bestimmten Drüsenart an einzelnen Speichelbestandteilen zu untersuchen.

I.) Trypsininhibitor

Für proteolytische Enzyme verschiedener Spezifität wie Kallikrein, Trypsin, Chymotrypsin und andere wurden Hemmstoffe (Inhibitoren) in tierischen und pflanzlichen Geweben sowie in Drüsensekreten und im Blutserum gefunden. Sie werden je nach ihrem Vorkommen in humorale Inhibitoren und Gewebsproteasehemmstoffe eingeteilt.

Fünf Proteaseinhibitoren konnte man bisher im menschlichen Serum elektrophoretisch unterscheiden:

das alpha-1-Antitrypsin, das alpha-1-Antichymotrypsin, den Interalphatrypsininhibitor, den C-1-Inaktivator und das alpha-2-Makroglobulin. Das alpha-1-Antitrypsin hat dabei durch die höchste Konzentration die Haupthemmwirkung.

In verschiedenen Arbeiten wurde in letzter Zeit über das Vorkommen niedermolekularer, säurestabiler Proteaseinhibitoren im Bronchialsekret und im Nasensekret berichtet (19, 25, 27). Diese Hemmstoffe wurden teilweise ausführlich analysiert und in Bezug auf ihr unterschiedliches Hemmverhalten charakterisiert. Die dabei gefundene Korrelation dieser Hemmstoffe ist ebenso bemerkenswert wie der Mangel an diesen Inhibitoren, den man bei bestimmten Krankheitsbildern der Nasen- und Bronchialschleimhaut festgestellt hat.

Das Molekulargewicht dieser säurestabilen Inhibitoren beträgt etwa 20 000. Sie werden in der Schleimhaut modifiziert und aktiv sezerniert. Die Inaktivierung von Leukocyten- und Bakterienproteasen im Mundbereich dürfte ihre Hauptaufgabe sein.

Aus diesen Gründen bot es sich an zu untersuchen, ob im Sekret der menschlichen Ohrspeicheldrüse ähnliche Hemmstoffe wie im Bronchial- und Nasen-

sekret vorkommen. Dabei besteht beim Ohrspeicheldrüsensekret im Gegensatz zum Nasen- und Bronchialsekret der Vorteil, daß man das Sekretionsverhalten hier neben den Ruhebedingungen auch unter Reiz überprüfen kann.

Um eine eventuelle Fehlerquelle auszuschalten, wurde zuvor das Ohrspeicheldrüsensekret in einem enzymatischen Test auf proteolytische Aktivität untersucht.

II.) Phosphatasen

Im Rahmen des Zellstoffwechsels nehmen Phosphatasen und Phosphoproteine eine zentrale Stellung ein. Im menschlichen Ohrspeicheldrüsensekret wurden bisher nur saure Phosphatasen gefunden (3, 4, 23, 26). Die Aufgabe der Phosphatasen und Phosphoproteine im Parotissekret ist noch unbekannt. Ebensowenig weiß man über eventuelle pathologische Veränderungen ihrer Sekretion bei Allgemeinerkrankungen oder bestimmten Erkrankungen der Mundhöhle.

Bei Sekretionsuntersuchungen von phosphorelierten Proteinen im Parotissekret fand EGGERS - LURA (11), daß sich die organische Phosphatfraktion des Parotisspeichels aus Kreatinphosphat, Adenosintriphosphat, Hexosephosphat und Phosphodiglycerat zusammensetzt. Diese energiereichen Phosphate sind, wie man weiß, die Energielieferanten des Zellstoffwechsels.

Wichtige Aufgaben haben Calcium und Phosphor im Stoffwechsel des Zahnschmelzes. Bei Messungen der Phosphatausscheidung der menschlichen Speicheldrüsen fand EGGERS-LURA (11), daß in der gesamten Tagesmenge von 1500 ml Speichel etwa 25 % des Gesamtphosphorbedarfes des Körpers im Speichel sezerniert werden.

Daraus kann man schließen, daß diesen Phosphaten und sicher auch den Phosphatasen neben der lokalen Bedeutung in der Mundhöhle, bei Zahnschmelzstoffwechsel und Mundschleimhautresorption eine nicht unwesentliche Rolle im gesamten Verdauungsvorgang zukommt.

Es lag daher nahe, im Rahmen dieser Untersuchung auch das Sekretionsverhalten der Phosphatasen unter Ruhe- und Reizbedingungen zu prüfen.

III.) BAEE - Esterase (Kallikrein)

SECKER sowie FELDBERG u.a. (30, 12) fanden erstmals die blutdrucksenkende Wirkung von intravenös appliziertem Speichel. Diese blutdrucksenkende Wirkung identifizierten WERLE und Mitarbeiter (33) als Kallikreinwirkung. Die Kallikreine sind nach WERLE (33) eine Gruppe von Enzymen, die aus Kininogen, einem Glykoproteid der alpha-2-Globulinfraktion des Serums, sogenannte Kinine freisetzen. Kinine, Peptide aus zehn oder elf Aminosäuren, sind die

Mediatoren der Kallikreineffekte: Vasodilatation, Vasopermeabilitätserhöhung, Schmerz, Kontraktionssteigerung an Bronchien, Magen, Darm und Uterus.

Die Serum- (oder Plasma-) kallikreine unterscheiden sich durch ihr relativ hohes Molekulargewicht von den niedermolekularen sogenannten Organ- (oder Drüsen-) kallikreinen. Letztere scheinen untereinander näher verwandt zu sein.

Kallikrein liegt in den Speicheldrüsen in enzymatisch aktiver Form vor (13). BHOOLA und Mitarbeiter (7, 8, 9) konnten histochemisch und elektronenmikroskopisch das Kallikrein bei den von ihnen untersuchten Tierspezies in den Azinuszellen der serösen Speicheldrüsen und in den Schaltstücken in Granula nachweisen. Diese Granula verhalten sich in der Ultrazentrifuge wie Mitochondrien.

Die Meinungen über die physiologischen Aufgaben des Kallikreins in den Speicheldrüsen sind geteilt. Auf Grund umfangreicher Untersuchungen stellten HILTON und LEWIS (17, 18) die Hypothese auf, daß Kallikreine durch die Freisetzung von Kininen die Hauptmediatoren in der Durchblutungsregelung der Speicheldrüsen seien. Demgegenüber sind SCHACHTER und BEILENSEN (28, 29) der Meinung, daß die Durchblutung auch unabhängig vom Kallikrein gesteuert werden kann.

Auf Grund der ihm zugeschriebenen Bedeutung sollte im Rahmen dieser Untersuchung auch das Kallikrein menschlicher Parotisdrüsen in seinem Sekretionsverhalten unter Ruhe und Reiz untersucht werden.

C) Experimenteller Teil

I.) Sekretgewinnung

Bei den zu untersuchenden Speicheldrüsen gesunder Probanden wurden anamnestisch und blutchemisch Diabetes mellitus, Leberfunktionsstörungen, Hyperlipidämien, Nierenfunktionsstörungen, Übergewicht, Hypertonie und endokrinologische Erkrankungen ausgeschlossen.

Nach Einführen eines Polyvinylkatheters mit einem inneren Durchmesser von 0,5 mm und einem Gesamtdurchmesser von 1,0 mm etwa 20 mm intraluminär in den Ductus parotideus wurde zunächst in zehnminütigen Fraktionen 40 Minuten lang unstimuliertes Sekret in Reagenzgläsern in einem Fraktionsteiler gesammelt. Anschließend wurde ein Teil der Probanden gustatorisch mit Ascorbinsäure peroral in Form von Lutschtabletten (100 mg/ 10 min.) über einen Zeitraum von 50 Minuten gereizt. Der andere Teil der Probanden wurde durch subkutane Injektion von Pilocarpin (0,075 mg / kg KG) stimuliert. Die Sekrete wurden während der Entnahme in Eiswasser gekühlt und unmittelbar nach Beendigung der Abnahme getestet.

II.) Durchführung der Versuche und Auswertung

1.) a) Proteolytische Aktivität

Material: Von fünf Probanden beiderlei Geschlechts wurden verschiedene unter Ruhe und Reiz gewonnene Fraktionen untersucht.

Versuchsbeschreibung

P r i n z i p : Azocasein wird durch Proteinasen gespalten, wobei in Trichloressigsäure lösliche Bruchstücke entstehen; nicht angegriffenes Azocasein wird durch Trichloressigsäure präzipitiert, das Präzipitat durch Zentrifugieren entfernt.

Die Extinktion des Überstandes mißt man bei 366 nm. Durch Vergleich der Werte mit einer Standardkurve, die mit Hilfe einer Trypsinlösung bekannter Konzentration aufgestellt wurde, ermittelt man die Aktivität der in den Proben enthaltenen Proteinasen.

G e r ä t e : Eppendorf Filterphotometer (366 nm), Wasserbad 37°C, Stoppuhr, Zentrifuge

S t a m m l ö s u n g e n :

Puffer: In 1 l 0,05 M TRA-Puffer löst man 0,5 Mol NaCl und gibt 0,002 % Chlorhexidin dazu, pH-Einstellung mit 2 N NaOH auf pH 8,3 .

2%ige Azocaseinlösung (in Wärme lösen!)

5%ige Trichloressigsäure

A u s f ü h r u n g : 0,3 ml der jeweiligen Speichelprobe wird mit 0,7 ml TRA-Puffer versetzt. Nach Zugabe von 1 ml Azocaseinlösung wird eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dann gibt man 2 ml Trichloressigsäure hinzu und nach weiteren 20 Minuten zentrifugiert man 5 Minuten bei 4000 U/min. Die Extinktionsmessung des Überstandes bei 366 nm schließt sich an.

Zur Sicherheit wurde auch mit 0,1 bzw. 0,5 ml Speichelvolumen getestet und außerdem nach zweistündiger Inkubation gemessen, was an den Ergebnissen der Speicheltestung nichts änderte.

Ergebnis

Bei keinem der Einzeltests ergab sich auch nur annähernd ein Wert, der auf das Vorkommen von proteolytischer Aktivität im Parotissekret schließen läßt.

Inwieweit aber geringe Mengen an Proteinasen, die auf Grund der im nächsten Abschnitt angeführten Inhibitoren nur nicht zur Wirkung kommen, im Parotissekret vorhanden sind, läßt sich aus diesen Versuchen nicht sagen.

b) Trypsininhibitor

Material: Es wurden insgesamt 40 Probanden beiderlei Geschlechts im Alter von 18 - 61 Jahren untersucht.

Versuchsbeschreibung

P r i n z i p: Trypsin spaltet das Substrat N-Benzoyl-Arginin-p-Nitroanilid (BAPA). Die Menge des dabei pro Zeiteinheit freiwerdenden p-Nitroanilins, eines gelben Farbstoffes, ist proportional der Trypsinaktivität und wird anhand der Extinktionszunahme im Photometer gemessen. Kommt nun im Sekret ein Inhibitor für

Trypsin vor, so wird die Freisetzung des Farbstoffes durch bestimmte Sekretmengen mehr oder weniger gehemmt.

G e r ä t e : Eppendorf Filterphotometer (405 nm),
Wasserbad 25°C, Stoppuhr

S t a m m l ö s u n g e n :

Trypsinlösung: 1 mg Trypsin (Trypure novo^R)
wird in 10 ml 10⁻³ N HCl gelöst = 20 gamma / 0,2 ml

TRA-Puffer: Triäthanolamin wird 0,2 N mit
pH 7,8 angesetzt.

BAPA: 100 mg N-Benzoyl-Arginin-p-Nitroanilid
werden in 100 ml Aqua bidest. unter Erwärmen gelöst.

A u s f ü h r u n g : In 3 ml Glasküvetten von
1 cm Schichtdicke wird der Reihe nach einpipettiert: 0,2 ml Trypsinlösung, 0,1 - 0,4 ml
(je nach Aktivität) des auszutestenden Sekretes (ein Leerwert wird ohne Sekret angesetzt), auf 2 ml Endvolumen wird mit TRA-Puffer aufgefüllt. Dieses Gemisch wird zwei Minuten lang bei 25°C vorinkubiert. Dann gibt man 1 ml der Substratlösung BAPA hinzu. Anschließend wird mit dem Photometer über vier Minuten alle 60 Sekunden die Extinktion der einzelnen Küvetten bestimmt.

Aus der Extinktionsänderung der Testküvetten abzüglich des Leerwertes ergibt sich unter

Berücksichtigung der eingesetzten Sekretmenge und der Trypsinmenge der Gehalt der Testlösung an Trypsininhibitor (31).

Beispiel: 20 gamma Trypsin werden eingesetzt und 0,4 ml des Sekretes zugegeben. Die Extinktionsänderung in der Testküvette betrage 0,015 pro Minute. Da 1 gamma Trypsin im Testansatz eine Extinktionsänderung von 0,033 hervorruft, ergibt sich folgende Berechnung:

$$\frac{(33 - 15) \times 20 \times 2,5}{33} = \text{ImU/ml}$$

Ergebnis

Die Inhibitorkonzentration der unstimulierten Sekrete schwankt stark zwischen 5 und 21 mU/ml (Abb. 1 und 2). Die Gesamtausscheidung im Ruhesekret liegt zwischen 0,3 und 3,3 mU/min./Drüse (Abb. 3 und 4).

Bei Pilocarpinreiz steigt die Konzentration im Sekret bei ungefähr der Hälfte der Probanden deutlich an. Die andere Hälfte zeigt entweder ein Gleichbleiben oder einen Abfall der Inhibitorkonzentration (Abb. 1).

Im Gegensatz dazu fällt die Konzentration nach Ascorbinsäurereiz bei allen Probanden mehr oder weniger stark ab (Abb. 2).

Zieht man die Flußraten in die Berechnung mit ein und ermittelt so die Gesamtinhibitorausscheidung, so finden wir sowohl bei Pilocarpinreiz als auch bei Ascorbinsäurestimulation einen starken Anstieg der gesamtsezernierten Inhibitormenge (Abb. 3 und 4).

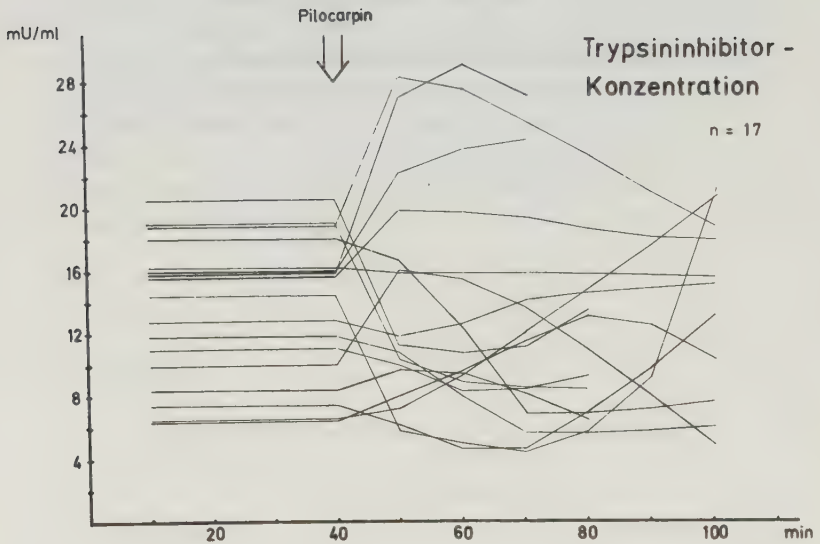


Abb. 1 Verhalten der Trypsininhibitorkonzentration nach chemischer Reizung mit subkutan injiziertem Pilocarpin (0,075 mg/ kg KG).

Das Verhältnis der ansteigenden Konzentrationskurven zu den abfallenden beträgt 1:1, wobei kein Zusammenhang mit der Höhe der Ruhekonzentrationen zu bestehen scheint.

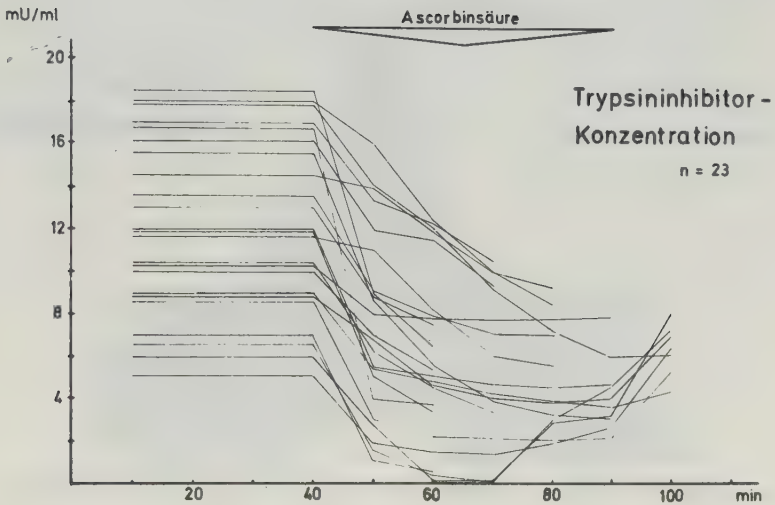


Abb. 2 Verhalten der Trypsininhibitorkonzentration bei gustatorischer Stimulierung mit Ascorbinsäure peroral (Cebion^R Lutschtabletten 100 mg / 10 min.)

Alle Konzentrationskurven zeigen einen mehr oder weniger starken Abfall, der über die gesamte Reizdauer anhält.

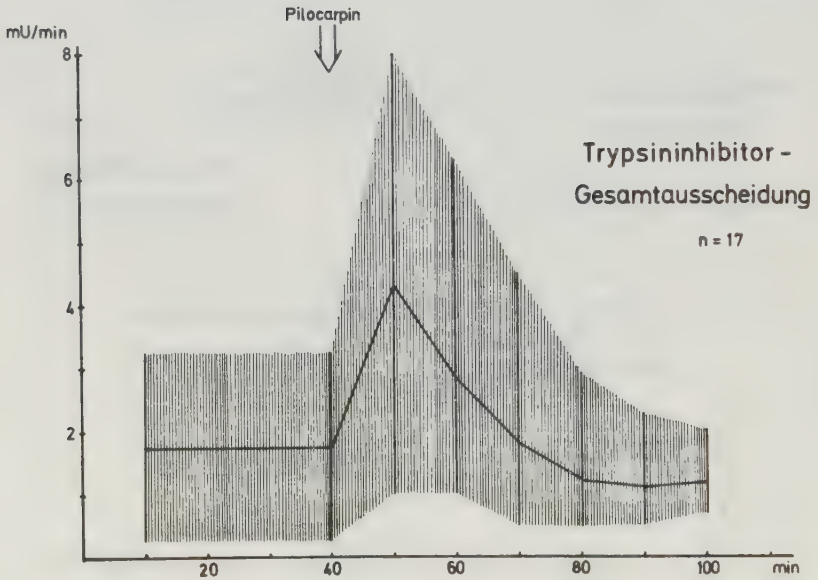


Abb. 3 Mittelwert und Streubreite der Gesamtausscheidung an Trypsininhibitor unter Ruhe und Reiz mit Pilocarpin

Nach kurzem Anstieg erfolgt ein gleichmäßiges Abfallen der Werte über 40 Minuten auf Werte unter dem Ruheniveau. Auffällig ist die starke Streubreite der Reizwerte.

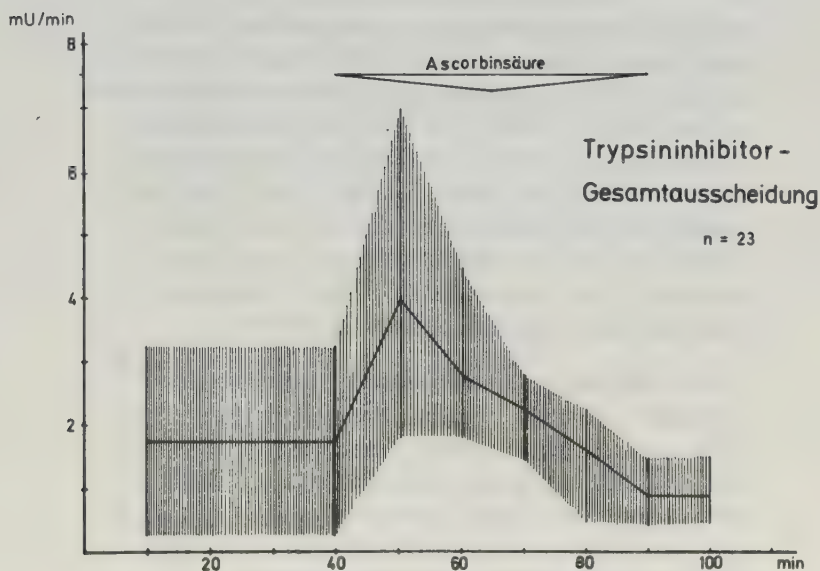


Abb. 4 Mittelwert und Streubreite der Gesamtausscheidung an Trypsininhibitor unter Ruhe und Reiz mit Ascorbinsäure

Nach kurzem Anstieg erfolgt ein etwas unregelmäßiges Abfallen über 40 Minuten auf Werte unter dem Ruheniveau.

Diskussion

Nachdem in früheren Untersuchungen bereits in der Nasenschleimhaut und im Bronchialsekret niedermolekulare Proteaseinhibitoren gefunden worden waren, gelang nun auch im menschlichen Parotissekret der Nachweis eines säurestabilen, niedermolekularen Proteaseinhibitors. Nach den bisherigen Untersuchungen ist er weitgehend identisch mit dem von HOCHSTRASSER und Mitarbeitern (20) charakterisierten niedermolekularen Inhibitor des Bronchialsekretes.

In der Mundhöhle werden durch Bakterien und Leukozytenzerfall laufend Proteasen frei, die inaktiviert werden müssen. Während im unteren Respirationstrakt die Hauptabwehrkraft und Schutzfunktion gegen proteolytische Aktivität dem alpha-1-Antitrypsin zukommt (6, 16, 25), ist im oberen Respirationstrakt die wesentliche Schutzfunktion gegen freiwerdende proteolytische Aktivität durch die niedermolekularen säurestabilen Proteaseinhibitoren abgesichert.

Die im Parotissekret gefundenen niedermolekularen Inhibitoren könnten also im Zusammenspiel mit den humoralen Abwehrstoffen Lysozym und Immunglobulin A, die bakterizid und bakteriolytisch wirken, freiwerdende Bakterienproteasen inaktivieren und eine schädliche

Einwirkung auf die Schleimhäute verhindern.
Es hat sich gezeigt, daß im Drüsensekret
gesunder menschlicher Ohrspeicheldrüsen
ein beachtlicher Gehalt an niedermolekularen
säurestabilen Inhibitoren nachweisbar ist.

2.) Phosphatasen

a) Alkalische Phosphatase

Material: Von mehreren Probanden beiderlei Geschlechts wurden verschiedene Sekretfraktionen aus Ruhe- und Reizphase getestet.

Versuchsbeschreibung

Die Testung auf alkalische Phosphatase wurde mit dem Reagenziensatz Merckotest^R Alkalische Phosphatase (Optimierter kinetischer Test) durchgeführt.

P r i n z i p: Bei der Bestimmung der alkalischen Phosphatase nach BESSEY, LOWRY und BROCK (5) dient p-Nitrophenylphosphat als Substrat. Durch die Enzymwirkung wird vom Substrat Phosphat abgespalten. Nach der Methode von RICK (15) läßt man die zu untersuchende Testlösung in der Küvette auf das Substrat einwirken und mißt drei Minuten lang alle 60 Sekunden die Extinktion. Die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit ist der Geschwindigkeit der Substratspaltung und damit der Enzymaktivität proportional.

G e r ä t e: Eppendorf Filterphotometer (405 nm)
Wasserbad 25°C zur Temperierung des Küvettenhalters, Stoppuhr

S t a m m l ö s u n g e n:

Puffer: 1 M Diäthanolamin-HCl-Puffer pH 9,8

P-Nitrophenylphosphat wird mit diesem Puffer als Puffersubstratlösung vorbereitet.

A u s f ü h r u n g: Die Puffersubstratlösung wird auf 25°C vorerwärmt. In 3 ml Glasküvetten pipettiert man jeweils 2,0 ml der Puffersubstratlösung und 0,02 ml der Testlösung. Nach dem Mischen wird die Extinktion bei 405 nm drei Minuten lang alle 60 Sekunden abgelesen. Aus einer Tabelle kann man mit Hilfe der Extinktionsänderung pro Minute die Volumenaktivität der alkalischen Phosphatase in der Testlösung in mU/ml angeben.

Ergebnis

In keiner der untersuchten Speichelfractionen wurde eine meßbare Aktivität alkalischer Phosphatase festgestellt.

b) Saure Phosphatase

Material: Es wurden insgesamt 28 männliche Probanden im Alter von 18 - 28 Jahren untersucht.

Versuchsbeschreibung

Die Testung auf saure Phosphatase wurde mit dem Reagenziensatz Merckotest ^R Saure Phosphatase durchgeführt.

P r i n z i p: Bei dieser Methode nach ANDERSCH und SZCYPINSKI (2) dient p-Nitrophenylphosphat als Substrat. Es wird durch das Enzym in p-Nitrophenol und Phosphorsäure gespalten. Die Reaktion wird durch Zugabe von Natronlauge unterbrochen. Das freigesetzte p-Nitrophenol geht dabei in das gelbgefärbte Anion über, das sich photometrisch bestimmen läßt. Die Menge des in der Zeiteinheit freigesetzten p-Nitrophenol ist der Enzymaktivität direkt proportional.

Bei Durchführung des Tests unter Zusatz von Tartrat kommt nur die tartratslabile saure Phosphatase zur Wirkung.

G e r ä t e: Eppendorf Filterphotometer (405 nm), Wasserbad 37°C, Stoppuhr

S t a m m l ö s u n g e n

Puffer: 50 mM Zitronensäurecitratpuffer pH 4,8

P-Nitrophenylphosphat wird mit diesem Puffer als 5,5 mM Substratlösung vorbereitet.

0,2 M Natriumtartratlösung

0,02 N Natronlauge

A u s f ü h r u n g:

Jede Sekretprobe wird mit und ohne Tartratzusatz getestet. Außerdem wird je Probe eine Blindprobe angesetzt.

Zunächst inkubiert man 1 ml Substratlösung pro Reagenzglas fünf Minuten bei 37°C . Nach Zusatz von 0,1 ml Tartratlösung in eines der beiden Analysengläser gibt man je 0,2 ml Sekret in die beiden Analysen. Nach dem Mischen wird genau 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Danach stoppt man die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Natronlauge und ergänzt die Blindprobe nach Art der Analysen mit ebenfalls 10 ml Natronlauge und 0,2 ml der jeweiligen Sekretprobe.

Die Extinktionsmessung der beiden Analysen gegen die Blindprobe erfolgt bei 405 nm Wellenlänge in 3 ml Glasküvetten mit Schichtdicke 1 cm. Durch Multiplikation der Extinktion mit dem Faktor 101 erhält man die Volumenaktivität in internationalen Enzymeinheiten(mU/ml).

Ergebnis

V o r b e m e r k u n g: Bei allen Probanden wurden vor Untersuchung der Speichelsekrete jeweils die Enzymaktivitäten an saurer und alkalischer Phosphatase im Serum bestimmt. Es wurden nur Probanden untersucht, deren Serumphosphatasewerte im Normbereich lagen.

Aktivität der tartrathemmbar sauren Phosphatase

Den weitaus größeren Anteil an saurer Phosphataseaktivität im Parotissekret hat die tartrathemmbar saure Phosphatase. Ihre Konzentration schwankt in den Ruhesekreten zwischen 1,4 und 6,2 mU/ml (Abb. 5 und 6).

Durch die beiden Reize mit Pilocarpin bzw. Ascorbinsäure ändert sich das Verhalten der Konzentrationen sehr unterschiedlich.

Auf Ascorbinsäurereiz fällt die Konzentration bei allen von uns untersuchten Drüsen stark ab, und zwar auf Werte, die etwa 40 - 60 % des Ausgangswertes betragen. In der zweiten Fraktion, d.h. 20 Minuten nach Beginn des Reizes, erreichen die meisten Konzentrationskurven ihren tiefsten Punkt. Sie bleiben dann für die Dauer des Reizes auf diesem Niveau oder steigen wieder leicht an. Es ergeben sich also keine Anzeichen für eine Erschöpfung der Drüsen unter anhaltenden Reizbedingungen (Abb. 5).

Ein sehr unterschiedliches Verhalten der ausgeschiedenen Konzentrationen zeigte sich bei den verschiedenen Drüsen nach Pilocarpinreiz. Die meisten Drüsen zeigen zunächst einen mäßigen Konzentrationsanstieg. Bei einem kleinen Teil der Drüsen jedoch fällt die Konzentration zunächst ab, um etwa nach 30 Minuten ihren Ausgangswert wieder zu erreichen und dann sogar etwas anzusteigen (Abb. 6).

Unter Berücksichtigung der Flußraten läßt sich über die Gesamtausscheidung der tartrathemm-
baren sauren Phosphatase folgendes sagen:

Die Schwankungsbreite der Ausscheidungsraten
ist in Ruhe wesentlich geringer als bei den
Konzentrationen. Sie beträgt durchschnittlich
0,3 mU/min.

Unter Ascorbinsäurereiz steigt die Ausschei-
dungsrate bereits nach zehn Minuten auf unge-
fähr das 2,5fache ihres Ausgangswertes an.
Dagegen ist bei Pilocarpinreiz die Ausschei-
dungssteigerung beträchtlich und erreicht be-
reits nach zehn Minuten ihr Maximum mit einem
Vielfachen des Ausgangswertes.

Während der gesamten Ascorbinsäurestimulation
von 50 Minuten bleibt nun die Ausscheidungs-
rate auf ungefähr gleicher Höhe, um bereits
10 Minuten nach Beendigung der Stimulation
ihren Ausgangswert wieder zu erreichen. Nach
Pilocarpinreiz beginnt die Ausscheidungsrate
zwar nach bereits nach 20 Minuten wieder kon-
tinuierlich abzufallen, doch hat sie ihren
Ausgangswert auch 60 Minuten nach Reiz noch
nicht wieder erreicht (Abb. 7 und 8).

Aktivität der tartratstabilen sauren Phosphatase

Der Anteil der tartratstabilen sauren Phosphatase beträgt nur einen Bruchteil der Gesamtposphataseaktivität. Die Ruhesekretionskonzentration schwankt stark zwischen Werten von 0,1 und 1,2 mU/ml (Abb. 9 und 10).

Unter Stimulation finden wir dann ein reizspezifisches Verhalten der Konzentrationskurven:

Die gustatorische Stimulation durch Ascorbinsäure bewirkt in fast allen Fällen einen Konzentrationsabfall der ausgeschiedenen Phosphataseaktivität um 30 - 60 % des Ruhewertes, doch steigt unter anhaltendem Reiz nach 30 - 40 Minuten die Konzentration in der Regel wieder an, um nach 60 Minuten den Ausgangswert in den meisten Fällen wieder zu erreichen (Abb. 9).

Nach Pilocarpinreiz dagegen steigt bei fast allen Drüsen die Konzentration der tartratstabilen sauren Phosphatase deutlich an. Mit Abklingen der Pilocarpinwirkung fällt sie zwar wieder, doch erreicht sie in den meisten Fällen auch nach 60 Minuten nicht wieder die Ruhekonzentrationswerte (Abb. 10).

Unter Berücksichtigung der Flußraten finden wir für die Gesamtausscheidung an tartratstabiler saurer Phosphatase eine Ruhesekretionsrate von 0,03 - 0,3 mU/min., also große Schwankungsbereiche der einzelnen Drüsen.

Die sezernierte Gesamtenzymmenge steigt nach Pilocarpinreiz auf ein Vielfaches ihres Ausgangswertes an und erreicht während des Beobachtungszeitraumes von 60 Minuten nicht wieder die Ruhewerte.

Der auch nach gustatorischer Stimulierung der Drüsen durch Ascorbinsäure erfolgende Anstieg der Gesamtausscheidung liegt auf Grund der abfallenden Konzentration natürlich weniger noch als nach Pilocarpinreiz und erfolgt kontinuierlich während der gesamten Dauer des Reizes von 50 Minuten. Wie schon bei der tartrathemmbar sauren Phosphatase finden wir auch hier bereits zehn Minuten nach Ende des Ascorbinsäurereizes die Ruhewerte wieder (Abb. 11 und 12).

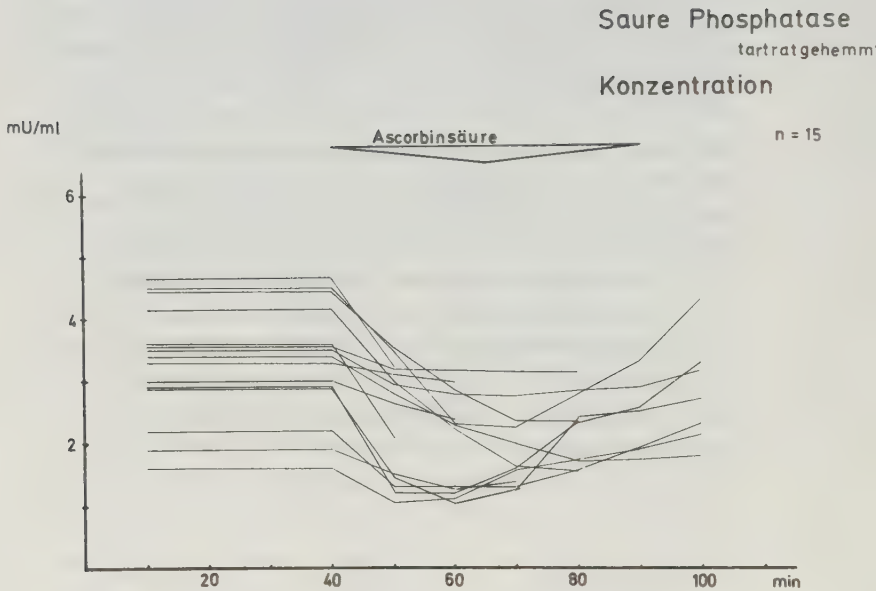


Abb. 5 Verhalten der Konzentration an tartrathemmbarer saurer Phosphatase bei gustatorischer Stimulierung mit Ascorbinsäure

Die Konzentration fällt zunächst in allen Fällen ab, erreicht nach ca. 20 Minuten ihren tiefsten Punkt und bleibt auf diesem Niveau bzw. steigt wieder leicht an bis zum Ende des Reizes.

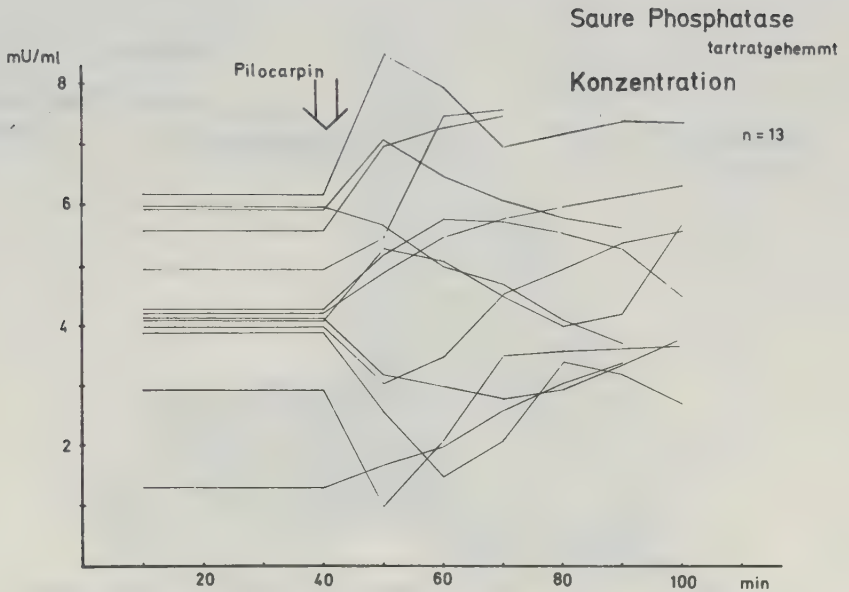


Abb. 6 Verhalten der Konzentration an tartrathemmbarer saurer Phosphatase nach chemischer Reizung mit Pilocarpin

Das genau gegensätzliche Verhalten der einzelnen Drüsen in Abfall und Anstieg bedarf weiterer Klärung.

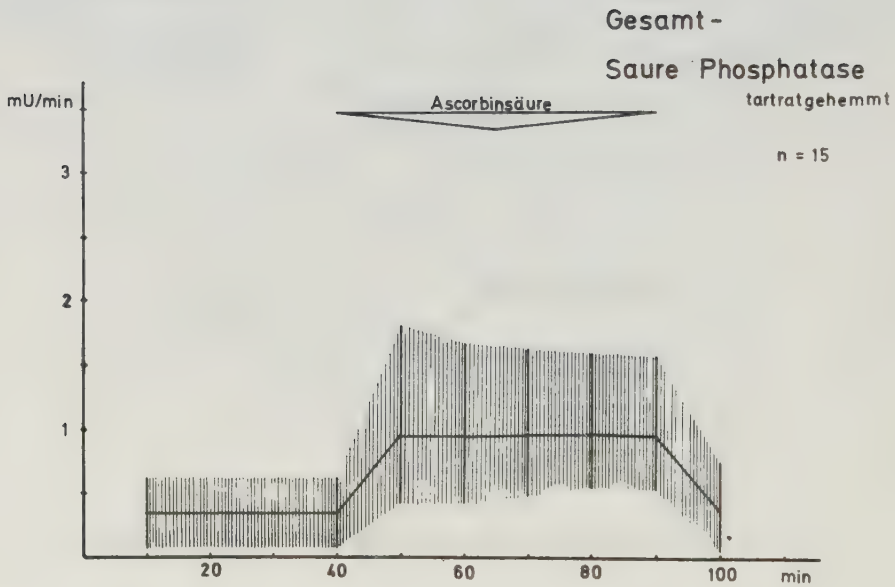


Abb. 7 Mittelwert und Streubreite der Gesamtausscheidung an tartrathemmbarer saurer Phosphatase unter Ruhe und Reiz mit Ascorbinsäure

Die plateauartig erhöhte Ausscheidung während der gesamten Dauer des Reizes zeigt keine Anzeichen für eine Erschöpfung der Drüsen innerhalb der beobachteten Reizdauer von 50 Minuten.

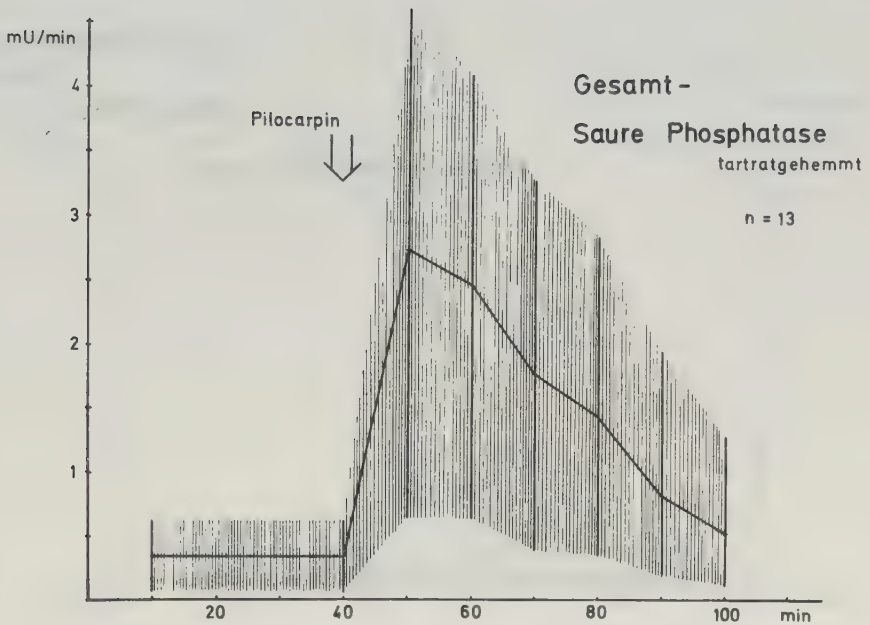


Abb. 8 Mittelwert und Streubreite der Gesamtausscheidung an tartrathemmbarer saurer Phosphatase unter Ruhe und Reiz mit Pilocarpin

In dem schnellen, starken Anstieg und dem langsamen Abfall der Werte zeigt sich eine ausgeprägte Wirkung von Pilocarpin auf die Phosphataseausscheidung der Drüsen. Auffällig ist die große Streubreite der Reizwerte.

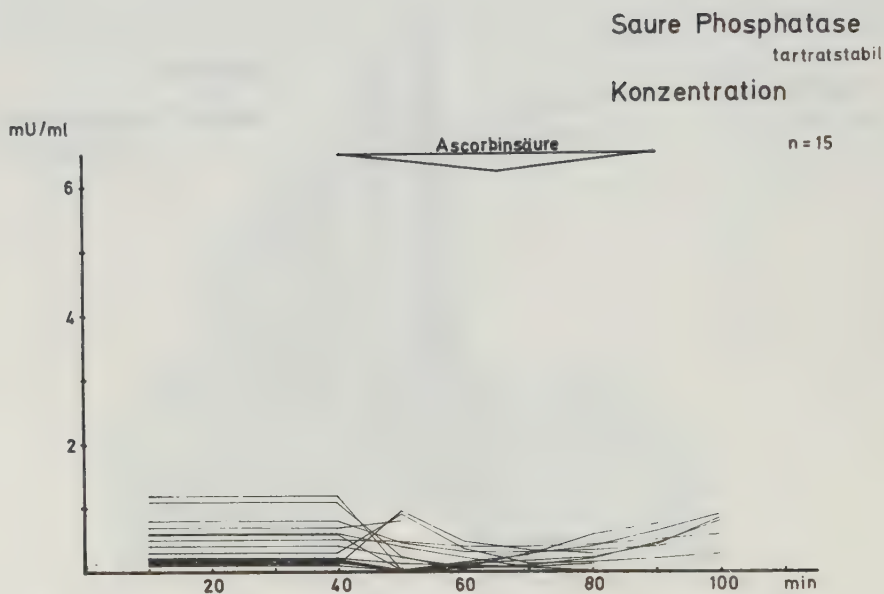


Abb. 9 Verhalten der Konzentration an tartratstabiler saurer Phosphatase bei gustatorischer Stimulierung mit Ascorbinsäure

Die insgesamt sehr niedrigen Konzentrationen fallen auf Reiz stark ab, erreichen aber bis zum Ende des Reizes fast alle wieder die Ausgangswerte.

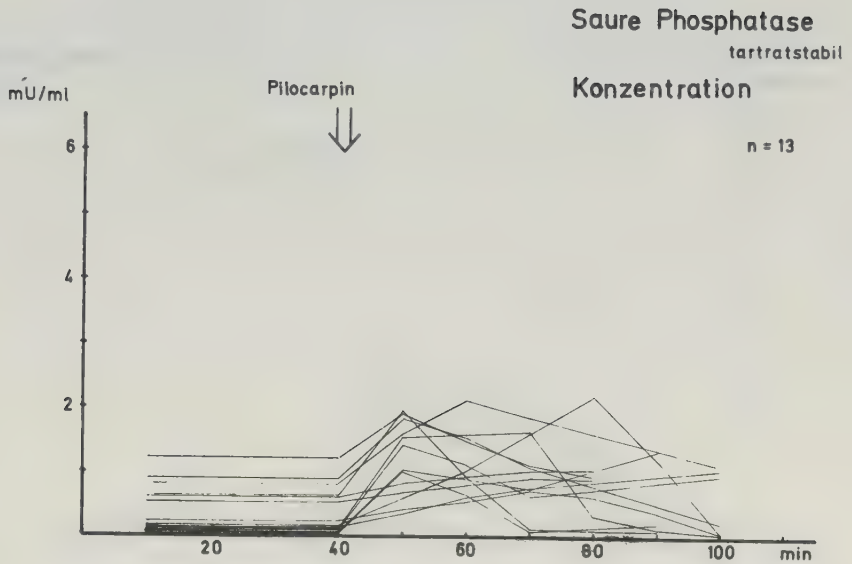


Abb.10 Verhalten der Konzentration an tartratstabiler saurer Phosphatase nach chemischer Reizung mit Pilocarpin

In dem starken Anstieg und dem längeren Verbleiben auf hohen Werten zeigt sich eine langanhaltende Pilocarpinwirkung.

Gesamt -
Saure Phosphatase
tartratstabil

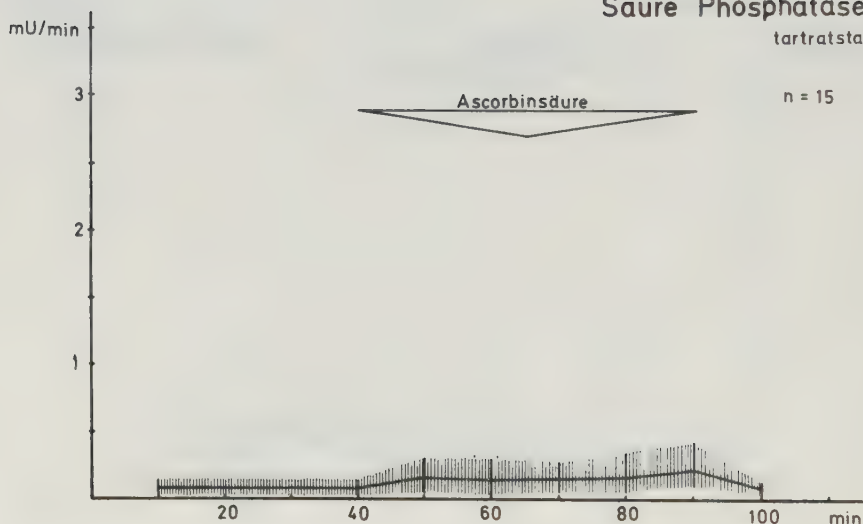


Abb.11 Mittelwert und Streubreite der Gesamtausscheidung an tartratstabiler saurer Phosphatase unter Ruhe und Reiz mit Ascorbinsäure

Auch hier zeigt sich wie in Abb.7 keine Erschöpfung der Drüsen. Die Ausscheidung bleibt bis zum Ende des Reizes erhöht.

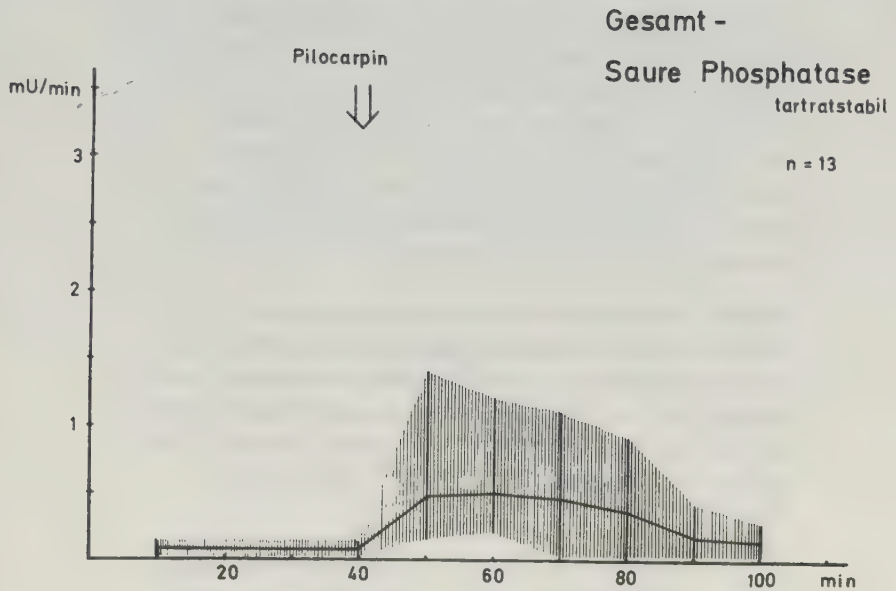


Abb.12 Mittelwert und Streubreite der Gesamtausscheidung an tartratstabiler saurer Phosphatase unter Ruhe und Reiz mit Pilocarpin

Wie in Abb.8 sieht man die ausgeprägte und anhaltende Pilocarpinwirkung an dem starken Anstieg und der langdauernden Erhöhung der Werte. Auffallend ist die große Streubreite der Reizwerte.

Diskussion

Die gefundenen Werte bei der Bestimmung der sauren Phosphatase stimmen mit bisherigen Veröffentlichungen weitgehend überein (3, 4, 23). Die meisten Untersucher beschrieben jedoch die Phosphataseaktivitäten im Speichelspeichel (11, 21, 22). Auch wurden von den verschiedenen Untersuchern unterschiedliche Bestimmungsmethoden zur Anwendung gebracht.

Übereinstimmend mit MEYER und NÜRNBERGER (23) fanden wir bei gustatorischer Stimulation bei allen untersuchten Drüsen einen Konzentrationsabfall der tartrathemmbarer sauren Phosphatase. Im Gegensatz dazu steigt bei einem Großteil der Drüsen die Konzentration nach Pilocarpinreiz deutlich an.

Für die tartratstabile saure Phosphatase liegen unsere Werte höher als die von MEYER und NÜRNBERGER (23) gefundenen Aktivitäten. Nach unseren Messungen macht die tartratstabile saure Phosphatase ungefähr 10 % der gesamten sauren Phosphataseaktivität aus. Ein deutlicher Anstieg der tartratstabilen sauren Phosphatasekonzentration zeigt sich unter Pilocarpinreiz. Dagegen ist das Sekretionsverhalten der einzelnen Drüsen unter Ascorbinsäurestimulation unterschiedlich.

Der Kalzium- und Phosphatstoffwechsel im Mundbereich steht in enger Beziehung zu Ossifikationsstörungen der Zähne, Periodontopathien und Karies (11). Da in Bezug auf die Gesamtspeichelsekretion die menschliche Ohrspeicheldrüse 30 % des Ruhesekretes und 70 % des Reizsekretes sezerniert, wäre es interessant zu klären, in welchem Zusammenhang die Sekretion der sauren Phosphatasen mit derartigen Krankheitsbildern steht. Ob bei Elektrolytstoffwechselstörungen auch die Speicheldrüsen hinsichtlich ihrer Phosphataseausscheidung beeinträchtigt werden, ist ebenfalls die Aufgabe weiterer Untersuchungen.

3.) BAEE - Esterase

Material: Es wurden insgesamt 40 Speicheldrüsen gesunder Probanden beiderlei Geschlechts im Alter von 18 - 61 Jahren untersucht.

Methode

Weitgehend spezifische Kallikreinbestimmungsmethoden beruhen auf der Freisetzung von Kininen und deren kontraktionssteigernden Wirkung an Organpräparaten oder auf der blutdrucksenkenden Wirkung, die in der Regel beim Hund gemessen wird. Diese biologischen Methoden zur Kallikreinbestimmung sind sehr aufwendig. Für unsere Zwecke benötigten wir jedoch eine Bestimmungsmethode, die auch im klinisch - chemischen Labor gut durchführbar ist. Dafür bieten sich die Verfahren an, die auf der durch Kallikrein katalysierten Hydrolyse von Estern des Arginins beruhen. Aus Arbeiten von FUJIMOTO und Mitarbeitern (14) geht hervor, daß gereinigtes Kallikrein aus menschlichem Mischspeichel sowohl N-Benzoyl-L-Argininäthylester (BAEE) als auch N-Tosyl-L-Argininmethylester (TAME) spaltet.

In der vorliegenden Arbeit wurde BAEE als Substrat gewählt. Zur Bestimmung von Kallikrein wurde nach dem von TRAUTSCHOLD und WERLE (32) angegebenen Verfahren vorgegangen. Der Test ist relativ wenig störan-

fällig gegenüber den in Körperflüssigkeiten vorkommenden Proteinen und anderen die UV-Strahlung absorbierenden Substanzen.

Versuchsbeschreibung

P r i n z i p: Kallikrein setzt aus N-Benzoyl-L-Argininäthylester (BAEE) durch esterolytische Spaltung Äthanol frei, dem durch Zugabe von Alkoholdehydrogenase H-Ionen entnommen werden. Durch Umwandlung von NAD^+ zu NADH^+ , welches photometrisch bestimmt werden kann, wird der Vorgang meßbar gemacht.

G e r ä t e: Zeiss - PMQ II - Spektralphotometer mit auf 25°C thermostatisiertem Küvettenhalter, Stoppuhr

S t a m m l ö s u n g e n:

Pyrophosphat (100mM) - Semicarbazid (100mM) -

Glycin (25mM) - Puffer pH 8,7

1 mM wässrige Lösung von Nicotinamid - Arginin - Dinucleotid (NAD^+)

0,5 mM wässrige Lösung von N-Benzoyl-L-Argininäthylesterhydrochlorid (BAEE)

Hefe - Alkoholdehydrogenase (Böhringer
100 mg/ 3,4ml)

A u s f ü h r u n g: In 1ml Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke wird pipettiert:

0,63 ml Puffer, 0,5 ml NAD^+ - Lösung, 0,1 ml

BAEE - Lösung, 0,01 ml ADH

Der Ansatz wird fünf Minuten bei 25°C inkubiert. Dann werden 0,05 bzw. 0,1 ml der zu untersuchenden Speichelprobe zugegeben (die Extinktionsänderung pro Minute soll im Bereich von 0,10 - 0,18 liegen) und aqua dest. bis zu einem Ansatzendvolumen von 1,0 ml zugesetzt und nochmals zwei Minuten inkubiert.

Anschließend wird die Extinktionszunahme gegen Wasser (in einer Vergleichsküvette) während zehn Minuten im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt.

Parallel dazu ermittelt man den Reagenzienleerwert an einem Ansatz ohne Speichelprobe.

Eine Einheit (U) BAEE - Esteraseaktivität ist definiert als diejenige Menge Enzym, die unter obigen Reaktionsbedingungen pro Minute ein Mol Äthanol aus BAEE freisetzt.

Diskussion der Bestimmungsmethode

Die hier verwendete Bestimmungsmethode für Kallikrein nach TRAUTSCHOLD und WERLE (32) wurde kürzlich von WORTHINGTON und CUSCHIERI (34) kritisiert und eine modifizierte Methode empfohlen, bei der die Reagenzien zunächst vorgemischt und 15 Minuten lang inkubiert werden, um eine zunächst auftretende relativ rasche Extinktionszunahme des Leerwertes abklingen zu lassen. Das Maximum der Extinktionszunahme findet jedoch, wie auch

diese beiden Autoren feststellten, während der ersten fünf Minuten statt. Da in der vorliegenden Arbeit die erste Ablesung der Extinktion erst sieben Minuten nach dem Mischen der Reagenzien vorgenommen wurde, besteht kein Unterschied zwischen den beiden Varianten des Testes.

Ob die im Versuch gemessene BAEE - Esteraseaktivität ausschließlich dem Kallikrein zukommt, ist allerdings nicht gesichert. BHOOLA und Mitarbeiter (10) zeigten zwar am menschlichen Mischspeichel eine Parallelität der TAME - Esteraseaktivität mit der Wirkung auf den Hundeblooddruck, und auch WOTMAN (35) fand in einigen Speichelproben eine Parallelität von freigesetzter Kininmenge und BAEE - Esterasewirkung. Jedoch nimmt nach MORIYA und Mitarbeitern (24) das Verhältnis der TAME - Esteraseaktivität zur vasodilatorischen (Kallikrein-) Aktivität im menschlichen Mischspeichel bei der Reinigung ab. Die von WOTMAN (35) angeführte Hemmung der Kininfreisetzung und der BAEE - Spaltung durch Trasylol beweist ebenfalls nicht die Identität der beiden verantwortlichen Enzymaktivitäten, denn Trasylol hemmt eine große Zahl verschiedener estero-lytisch wirksamer Proteasen.

Die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche werden daher im folgenden nicht als Kallikrein, sondern als BAEE - Esteraseaktivität diskutiert.

Ergebnis

Die Ruhekonzentrationen der BAEE - Esterase im Sekret menschlicher Parotisdrüsen weisen große Schwankungen auf. Sie liegen zwischen 8 und 48 mU/ml (Abb. 13 und 14).

Unter Ascorbinsäurereiz fällt die Konzentration rasch ab und erreicht nach zehn Minuten 30 - 50 % der Ruhewerte. Nach 50minütiger gustatorischer Stimulierung liegt die Konzentration bei 10 - 30 % der Ausgangswerte (Abb. 13).

Auf Pilocarpinreiz erfolgt der Konzentrationsabfall deutlich langsamer als nach gustatorischer Stimulierung. Zehn Minuten nach Reiz liegen die Konzentrationen bei 45 - 70 % der Ausgangswerte. Über den weiteren Beobachtungszeitraum von 50 Minuten bleiben die Konzentrationen dann annähernd konstant (Abb. 14).

Die großen Schwankungen der Ruhesekretkonzentrationen werden entscheidend durch die Flußrate der Drüsen pro Zeiteinheit bestimmt. Aus dem Produkt Speichelmenge mal Konzentration kann die Gesamtausscheidung an Enzymaktivität pro Zeiteinheit berechnet werden.

Die Ruheausscheidung schwankt zwischen 1,2 und 3,6 mU/min., also deutlich weniger als die Konzentration (Abb. 15 und 16).

Unter Ascorbinsäurereiz steigt die ausgeschiedene Menge an esterolytischer Aktivität auf 3 - 11 mU/min. an und fällt dann zunächst langsam, später deutlicher ab. Am Ende des Reizes nach 50 Minuten liegt sie ungefähr bei der Hälfte der Basissekretion und erreicht nach weiteren 20 Minuten wieder die Ausgangswerte (Abb. 15).

Bei Pilocarpinreiz verhält sich die Ausscheidung dahingehend anders, daß erstens der Streubereich der Maximalwerte größer ist und zweitens der Abfall der Gesamtausscheidung nach Erreichen des Maximums deutlich schneller geht als nach gustatorischer Stimulierung. Die bereits zehn Minuten nach Injektion erreichten Ausscheidungsmaxima liegen zwischen 1,8 und 12 mU/min. 40 Minuten nach Reiz liegt die ausgeschiedene Menge pro Zeiteinheit bei ungefähr 30 % der Basiswerte, steigt dann wieder an, erreicht aber nach weiteren 20 Minuten noch nicht wieder die Ausgangswerte. (Abb. 16)

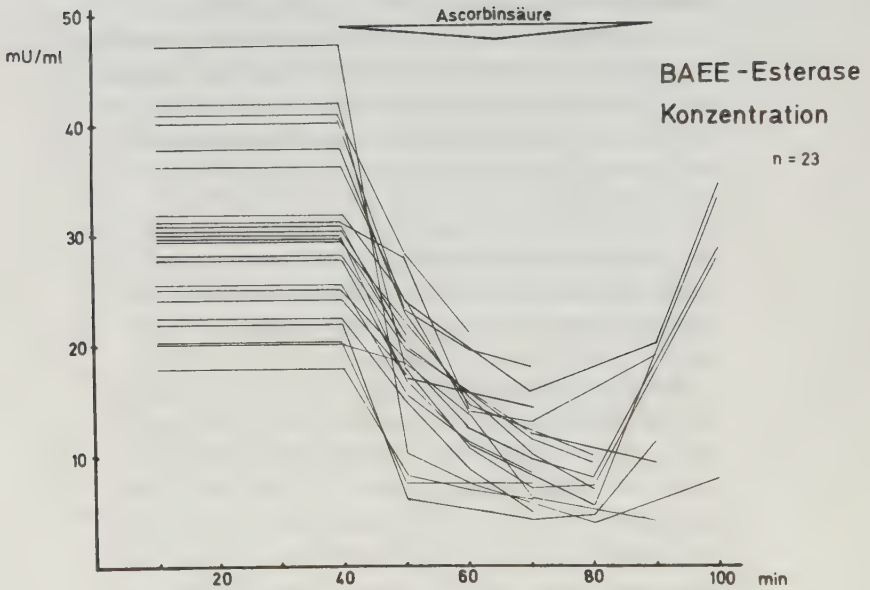


Abb.13 Verhalten der Konzentration an BAEE - Esterase bei gustatorischer Stimulierung mit Ascorbinsäure

Das starke Abfallen der Konzentrationen trotz Steigerung der Gesamtausscheidung (Abb.15) ist durch stark steigende Flußraten bedingt. Alle untersuchten Drüsen verhalten sich hier annähernd gleich.

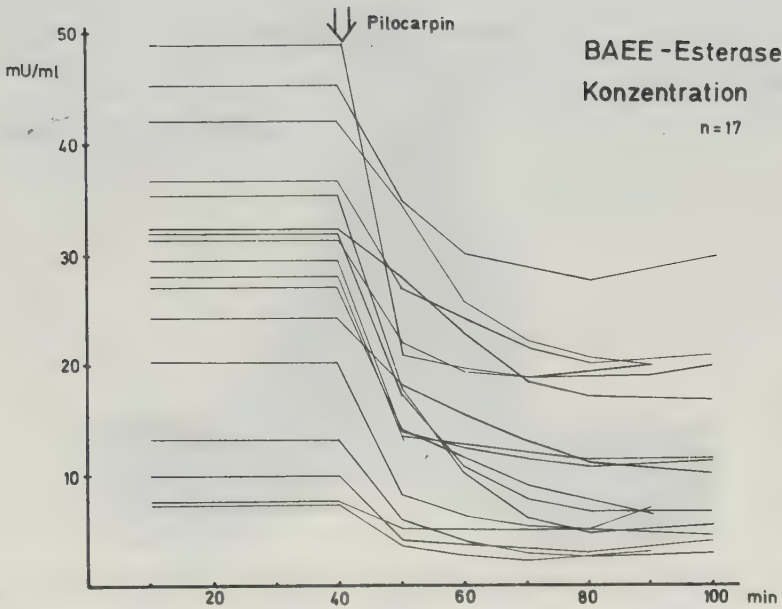


Abb.14 Verhalten der Konzentration an BAEE - Esterase nach chemischer Reizung mit Pilocarpin

Bei gleichartigem Verhalten aller untersuchten Drüsen scheint die Stärke des Abfallens der Reizwerte hier etwas von der Höhe der Ruhe-
werte abzuhängen.

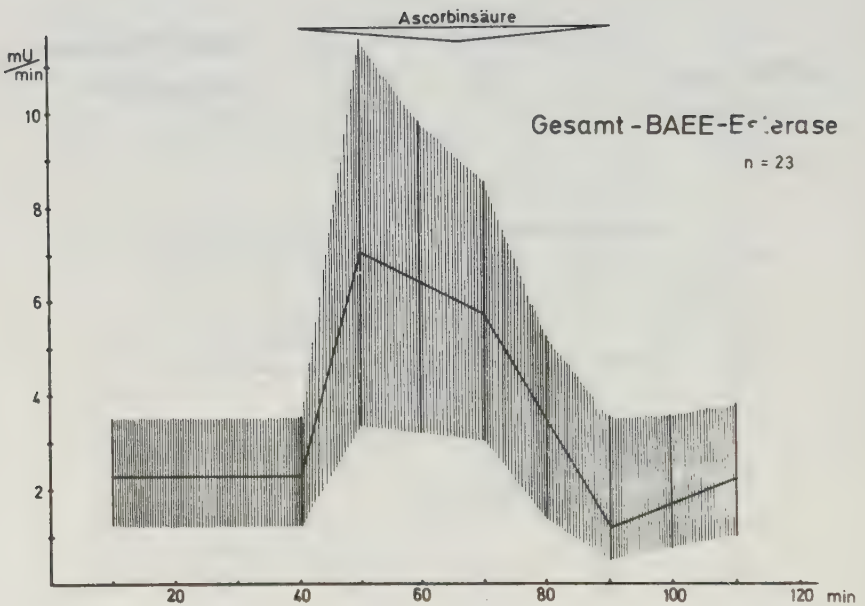


Abb.15 Mittelwert und Streubreite der Gesamtausscheidung an BAEE - Esterase unter Ruhe und Reiz mit Ascorbinsäure

Der Verlauf der Kurve spricht für eine beginnende Erschöpfung der Drüsen nach 50minütiger Reizdauer. Es findet allerdings eine rasche Erholung statt.

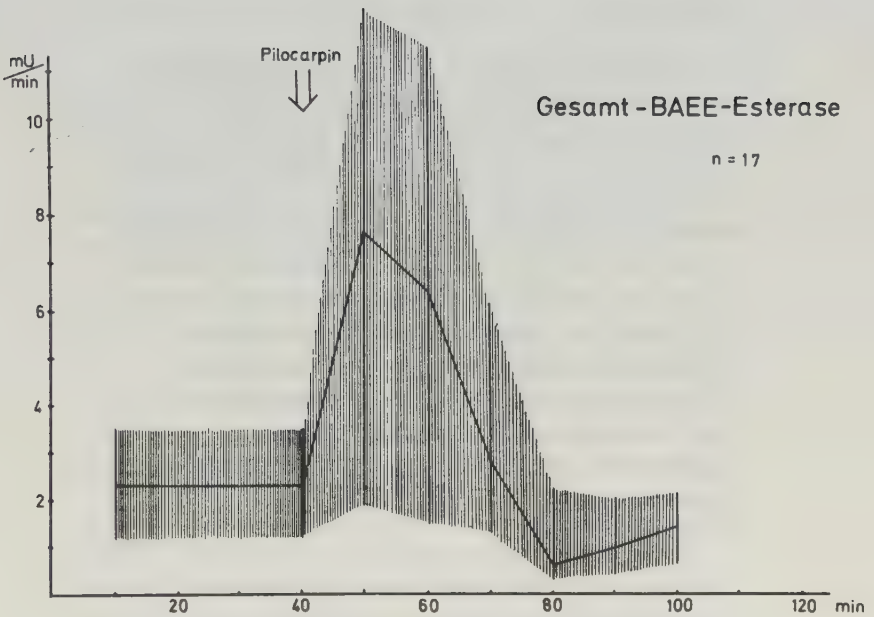


Abb.16 Mittelwert und Streubreite der Gesamtausscheidung an BAEE - Esterase unter Ruhe und Reiz mit Pilocarpin

Der kurzzeitige, starke Anstieg der Werte geht in einen raschen Abfall mit vorübergehender Unterschreitung der Ruhewerte über. Auffällig ist die große Streubreite der Reizwerte.

Diskussion

AMUNDSEN und NUSTAD (1) fanden im Parotisekret einen kininogenen Stoff, gehen jedoch nicht weiter auf die Konzentration ein. WOTMAN (35) gibt bei seinen Untersuchungen von paraffinstimulierten Parotis - und Mandibularissekreten menschlicher Probanden Werte von 18 - 91 Units an. WERLE und v.RODEN (33) fanden bei Aktivitätsbestimmungen von Kallikrein im menschlichen Mischspeichel, nachgewiesen durch die blutdrucksenkende Wirkung am Hund, im Ruhesekret wenig bis gar keine Aktivität, dagegen geben sie beim sogenannten Appetitseft nach gustatorischer Stimulierung Konzentrationen bis zu 1,5 KE/ml an.

Fraktionierte Untersuchungen der Ruhe- und Reizsekretkonzentrationen sind uns bisher nicht bekannt.

D) Z u s a m m e n f a s s u n g

Aufgabe dieser Arbeit war es, das Sekretionsverhalten von Trypsininhibitor, Phosphatasen und BAEE - Esterase der glandula parotis zu untersuchen. Durch fraktionierte Sekretgewinnung war es dabei möglich, zwischen Ruhe- und Reizbedingungen zu unterscheiden.

Es sollten Normalwerte gefunden werden, auf deren Grundlage nach signifikanten und eventuell diagnostisch verwertbaren Änderungen im Sekretionsverhalten der glandula parotis bei bestimmten Krankheitsbildern gesucht werden kann.

Bei allen ausgeführten Tests und Berechnungen wurden deutliche Änderungen in Ausscheidung und Konzentration der untersuchten Substanzen bei gustatorischer bzw. chemischer Reizung gefunden. Der Vergleich der beiden Reizvarianten jedoch ergab ein unterschiedliches Bild.

Im Falle der Gesamtausscheidung war bei allen untersuchten Substanzen für beide Reizformen ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen, der sich beim Trypsininhibitor und der BAEE - Esterase in gleichen Größenordnungen abspielte. Bei der sauren Phosphatase dagegen war der Gesamtausscheidungsanstieg auf Pilocarpinreiz wesentlich höher als auf Ascorbinsäurereiz.

Die Konzentrationen jedoch, die auf Ascorbinsäurereiz regelmäßig deutlich abfielen, zeigten bei Pilocarpinreiz Unterschiede nicht nur zwischen den vier untersuchten Substanzen, sondern auch zwischen den einzelnen Drüsen innerhalb einer Untersuchungsreihe.

Diese Unterschiede der Konzentrationsänderungen auf Pilocarpinreiz lassen sich wegen der gleichförmigen Reizantworten der Gesamtausscheidungen nur durch eine unterschiedliche Änderung der Flußraten der einzelnen Drüsen auf Pilocarpinreiz erklären.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) AMUNDSEN E., K. NUSTAD : Kininforming and destroying activities of saliva, Brit.J.Pharm. 23 (1964) 440
- 2) ANDERSCH M.A., A.J. SZCYPINSKI, Amer. J. Clin. Path. 17 (1947) 571
- 3) BENEDEK-SPÄT E.: The composition of unstimulated human parotid saliva, Arch. oral. Biol. 18 (1973) 39
- 4) BENEDEK-SPÄT E.: The composition of stimulated human parotid saliva, Arch. oral. Biol. 18 (1973) 1091
- 5) BESSEY O.A., O.H. LOWRY und M.J. BROCK, J. Biol. Chem. 164 (1946) 321
- 6) BINDER B.: Enzyme in "Die Funktion der Bronchialschleimhaut", Kolloquium hrsg. von F. Mlczoch, Wien 1974
- 7) BHOOLA K.D.: Intracellular distribution of submaxillary kallikrein, J. Physiol. 196 (1968) 431
- 8) BHOOLA K.D.: Comparative study of the subcellular distribution of submaxillary kallikrein, Biochem. Pharmacology 18 (1969) 1252

- 9) BHOOLA K.D., G.DOREY: Isolation of kallikrein containing granules from the pancreas and sub-maxillary gland of the cat, J.Physiol. 203 (1969) 59
- 10) BHOOLA K.D., M.W.McNICOL, S.OLIVER, J.FORAN: Changes in salivary enzymes in patients with sarcoidosis, New Engl.J.o.Med. 281 (1969) 877
- 11) EGGERS-LURA H.: Investigations on the salivary phosphates and phosphatases, J.D.Res. 26 (1947) 203
- 12) FELDBERG W., J.A.GUIMARAIS: Some observations on salivary secretion, J.Physiol. 85 (1935) 15
- 13) FREY E.K., KRAUT H., E.WERLE, R.VOGEL, G.ZICKGRAF-RÜDEL, I.TRAUTSCHOLD: Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, Stuttgart: Enke 1968
- 14) FUJIMOTO Y., H.MORIYA, Ch.MORIWAKI: Studies on human salivary kallikrein, I. Isolation of human salivary kallikrein, J.Biochem. 74 (1973) 239
- 15) HAUSAMEN T.-U., W.RICK, W.GROSS, R.HELGER, Clin. Chim. Acta 15 (1967) 241
- 16) HEUCKENKAMP P.U. u.a.: Die Trypsinhemmung in ausgewählten Sera eines poliklinischen Patienten-
sutes, Pneumonologie 148 (1973) 303
- 17) HILTON S.M., G.P.LEWIS: The mechanism of the functional hyperaemia in the submandibular gland, J.Physiol. 129 (1955) 253

- 18) HILTON S.M., G.P.LEWIS: The relationship between glandular activity, bradykinin information and functional vasodilatation in the submandibular salivary gland, J.Physiol. 134 (1956) 371
- 19) HOCHSTRASSER K. u.a.: Zur Frage der gleichzeitig vorhandenen proteolytischen und antiproteolytischen Aktivität im Sputum bei obstruktiven Atemwegserkrankungen, Respiration 31 (1974) 343
- 20) HOCHSTRASSER K. u.a.: Isolierung und Charakterisierung eines Proteaseninhibitors aus menschlichem Bronchialsekret, Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 353 (1972) 221
- 21) LIONETTI F.J., H.CHAUNCEY, V.F.LISANTI: Human parotid salivary acid phosphomonoesterase, Biochim.Biophys.Acta 24 (1957) 28
- 22) MÄKINEN K.K.: Studies on oral enzymes IV. Fractionation and characterisation of various hydrolytic enzymes in human saliva, Acta odont. scand. 24 (1966) 709
- 23) MEYER P., E.NÜRNBERGER: Zur Sekretion von Amylase und saurer Phosphatase durch die Parotis vor und nach gustatorischer Stimulierung unter Berücksichtigung der Enzymkonzentration und der Enzymsekretionsrate, Laryng.Rhinol. 35 (1974) 223

- 24) MORIYA H., K.YAMAZAKI, H.FUKUSHIMA: Biochemical studies on kallikreins and their related substances, I. Isolation and purification of human saliva kallikrein, J. Biochem. 58 (1965) 201
- 25) RASCHE B., W.T.ULMER: Über die Möglichkeiten der Inaktivierung der Proteasenaktivität im Sputum bei chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen durch Proteaseinhibitoren; Resp.exp. Med. 158 (1972) 229
- 26) RAUCH S.: Die Speicheldrüsen des Menschen, Thieme Stuttgart 1955
- 27) REICHERT R. u.a.: Nachweis eines niedermolekularen Proteaseinhibitors im menschlichen Bronchialsekret, Laryng. Rhinol. 51 (1972) 190
- 28) SCHACHTER M.: Kallikrein and vasodilatation in the salivary gland, in: Hypotensive peptides, edited by E.Erdös, N.Back, F.Sicuteri and A.F. Wilde, Springer-Verlag New York 1966, p. 275
- 29) SCHACHTER M., S.BEILENSEN: Mediator of vasodilatation in the submaxillary gland, Fe. Proceed. Vol. 27 (1968)
- 30) SECKER J.: The humoral control of the secretion by the submaxillary gland of the cat following chorda stimulation, J. Physiol. 81 (1934) 81
- 31) TRAUTSCHOLD I.: Habilitationsschrift, Med.Fak. München 1965

- 32) TRAUTSCHOLD I., E.WERLE: Spektrophotometrische Bestimmung des Kallikreins und seiner Inaktivatoren, Hoppe-Seyler's Z.f. phys.Chem. 325 (1961) 48
- 33) WERLE E., P.v.RODEN: Über das Vorkommen von Kallikrein in den Speicheldrüsen und im Mundspeichel, Biochem.Zeitschr. 286 (1936) 213
- 34) WORTHINGTON K.J., A.CUSCHIERI: A study on the pancreatic kallikrein with the substrate benzoyl arginine ethyl ester using a spectrophotometric assay, Clin.Chim.Acta 52 (1974) 129
- 35) WOTMAN S., L. GREENBAUM, I.D.MANDEL: Studies on human salivary kallikrein, Bioch. Phar. 18 (1969) 1261

Herrn Prof. Dr. H.H. Naumann danke ich für die Überlassung des Themas und die guten Arbeitsbedingungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.Do. Dr. H. Eichner für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit und die stete hilfreiche Unterstützung.

LEBENS LAUF

Ich, Wolfgang Michael Hepperle, wurde am 15.2.1951 als Sohn des Regierungsmedizinaldirektors Dr. med. Karl Hepperle und seiner Ehefrau Karoline, geb. Feeß, in Memmingen geboren.

Von 1957 - 64 besuchte ich die Volksschule in Neu-Ulm und anschließend das Neusprachliche Gymnasium Neu-Ulm bis zu meiner Reifeprüfung am 20.6.1970.

Zu Beginn des Wintersemesters 1970/71 immatrikulierte ich mich an der Ludwig Maximilians-Universität München für das Studienfach Humanmedizin. Am 2.4.1973 bestand ich dort das Physikum.

Während des klinischen Teils meiner Ausbildung famulierte ich in der

Inneren Abtg. der Krankenanstalt Rotes Kreuz
in München,
Chirurg. Privatklinik Dr. Schreiber in München,
Abtg. f. Anästhesiologie der Chirurg. Universitätsklinik München.

Am 14.6.1976 beendete ich mein Studium mit der Ärztlichen Prüfung.

Ich beabsichtige, mich nach meiner Approbation und einer entsprechenden klinischen Ausbildung als Arzt für Allgemeinmedizin niederzulassen.

